

file copy



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑩ ⑫ **Offenlegungsschrift**
DE 100 19 289 A 1

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/415
C 07 H 21/04

②① Aktenzeichen: 100 19 289.0
②② Anmeldetag: 19. 4. 2000
④③ Offenlegungstag: 8. 11. 2001

DE 100 19 289 A 1

⑦① Anmelder:

Münch, Michael Anton, 84478 Waldkraiburg, DE;
Schieberle, Peter, Prof. Dr., 85354 Freising, DE;
Fischer, Markus, Dr.rer.nat., 80337 München, DE;
Bacher, Adelbert, Prof. Dr.med. Dr.rer.nat., 85748
Garching, DE

⑦② Erfinder:

gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Analysenverfahren für den Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoprodukten

⑤⑦ Da ein erheblicher Teil der Kakaobohnenernte (10-20%) von minderer Qualität ist und sich von diesen Bohnen die Samenschalen meist nur sehr schwer entfernen lassen, begrenzt die Kakaoverordnung aus Qualitätsgründen den Gehalt an Schalenanteilen einschließlich Keimwurzeln bei Kakaokernen und Kakaomassen auf 5%, bezogen auf die fettfreie Trockenmasse. Bis zu diesem Wert kann ein Anteil als technologisch nicht vermeidbar angesehen werden.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für den Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoerzeugnissen, wobei ein kakaoschalenspezifisches DNA-Fragment (ca. 250 bp) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und anhand von Vergleichsmustern mit definierten Kakaoschalengehalten semiquantitativ zugeordnet.

Die Bereitstellung eines Test-Kits, der dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Primer A und B sowie Puffer in lyophilisierter Form enthält, erfordert lediglich die Zugabe von aus Kakaomaterial isolierter Template-DNA.

Selbst in thermisch stark behandelten Proben wie Schokolade ist eine hohe Nachweisempfindlichkeit gegeben, ein Schalengehalt ab 0,5% kann semiquantitativ ermittelt werden.

DE 100 19 289 A 1

Beschreibung

- [0001] Verfahren für den Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoprodukten, wobei ein kakaoschalenspezifisches DNA-Fragment (ca. 250 bp) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und anhand von Vergleichsmustern mit definierten Kakaoschalengehalten semiquantitativ zugeordnet.
- [0002] Das Primerpaar hat folgende Nucleotidsequenzen:
 Primer A: 5'-TGC GGT GGT ATT CTG CCA GAA C-3' (Strang-Primer)
 Primer B: 5'-CGC GCA ACA CAT CCT TCA TGC-3' (Gegenstrang-Primer).
- [0003] Es wird ferner ein Test-Kit bereitgestellt, der dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Primer A und B sowie Puffer in lyophilisierter Form enthält.
- [0004] Eine hohe Nachweisempfindlichkeit auch thermisch behandelter Proben ist gegeben; ein Schalengehalt ab 0.5% kann semiquantitativ ermittelt werden.

15 Beschreibung

- [0005] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoprodukten. Bevor Rohkakao zur Herstellung von Kakaoerzeugnissen wie Kakaomasse, Kakaopulver und auch Kakaobutter eingesetzt werden kann, sind die wertlosen Schalenanteile im Rahmen des technisch Möglichen weitestgehend zu entfernen. Ein erheblicher Teil der Kakaobohnenernte (10-20%) ist von minderer Qualität. Von diesen Bohnen läßt sich die Schale meist nur sehr schwer entfernen.
- [0006] Die Kakaoverordnung begrenzt aus Qualitätsgründen deshalb den Gehalt an Schalenanteilen einschließlich Keimwürzelchen bei Kakaokernen und Kakaomassen auf 5 % bezogen auf die fettfreie Trockenmasse. Bis zu diesem Wert kann ein Anteil als technologisch nicht vermeidbar angesehen werden.
- [0007] Höhere Schalenanteile sind als qualitätsmindernd anzusehen, sei es weil Kakao dadurch gestreckt wird oder die Bohnen, vor allem bei minderen Qualitäten, nicht in ausreichendem Maße von den Schalen und Keimwürzelchen befreit wurden. Während bei Kakaomasse und letztendlich auch bei Schokoladen der Schalenanteil selbst von Interesse ist, geht es bei der Qualitätsbeurteilung von Kakaobutter, insbesondere von Kakopressbutter darum, inwiefern diese aus zu schalenreichen Rohstoffen abgepreßt wurde. Auch eine Gewinnung durch zu starke Abpressung gilt es zu unterbinden, da hierbei zu hohe Anteile an Schalenfett und anderen unerwünschten Begleitsubstanzen in die Kakaobutter übergehen. Der Nachweis von Kakaoschalen als Verfälschung von Kakaoprodukten ist mit zunehmender Verfeinerung der Zerkleinerungstechnik immer schwieriger zu führen.

35 Bisher eingesetzte Verfahren für die Analyse von Kakaoschalen in Kakaoprodukten

- [0008] Zur Bestimmung des Schalengehaltes in Kakaoerzeugnissen wurden bisher zahlreiche mikroskopische sowie chemische Verfahren herangezogen.

40 Mikroskopische Verfahren

- [0009] Zur mikroskopischen Bestimmung des Schalenanteiles zählen Hanausek [1916] und Huss [1916] die in der Kakaoschale regelmässig auftretenden Schleimzellen aus. Sie gehen dabei jedoch von der unbewiesenen Vermutung aus, dass bei allen Kakaosorten die Zahl der Schleimzellen pro Schalengewicht konstant ist. Fischer [1900] schlug die Bestimmung der Zahl der Sklereiden in der Kakaoschale, die bei allen Sorten zu einem einschichtigen Mantel zusammengefügt sind, vor. Aus der Anzahl der Sklereiden, ihrer Länge und Breite kann auf die Oberfläche der Steinzellenschicht und somit, unter bestimmten Voraussetzungen, auf den Schalenanteil rückgeschlossen werden. Wenn diese Methoden auch von Ezendam [1924], Griebel und Sonntag [1926] Alpers [1927] Wagenaar [1929] Hermann [1937] Josephy [1953, 1956], Sachsse und Geuting [1956] Schetty [1956] und Sandbäck [1957] verbessert und vereinfacht wurden, so bleiben sie dennoch sehr arbeitsaufwendig. Ferner berücksichtigen diese Methoden nicht oder nur unzureichend, dass die Zahl der Sklereidzellen bei gegebenem Schalengehalt mit zunehmendem Zerkleinerungsgrad stark abnimmt. Van Breederode und Reeskamp [1957] untersuchten systematisch den Zusammenhang zwischen dem Zerkleinerungsgrad einerseits und der Zahl der Sklereidenzellgruppen sowie der Zahl der Sklereiden je Gruppe andererseits. Eine gewisse weitere Vereinfachung stellt die von Ruge [1970] angewendete Polarisationsmikroskopie dar. Dabei wurde nach Entfettung und Säureaufschluss des Kakaopulvers im Polarisationsmikroskop der Flächenwert der aufleuchtenden Partikel als Mass für den Schalenanteil ermittelt. Meursing [1973] berechnete den Schalengehalt nach Isolierung und Anreicherung der Steinzellengruppen. Dabei wurden die Zahl der Steinzellengruppen sowie die Anzahl der Steinzellen pro Gruppe ausgezählt. Der Schalenanteil wurde daraus über eine empirisch aufgestellte Eichkurve, bei der die Zahl der Steinzellengruppen zu der durchschnittlichen Anzahl von Steinzellengruppen eines Kakaoprodukts mit 1%-igem Schalengehalt in Relation gesetzt wurde, ermittelt. Zudem wurde versucht, eine Korrektur der Zellen, die während des Zerkleinerungsprozesses verloren gingen, vorzunehmen.

60 Physikalische und chemische Verfahren

- [0010] Zur Bestimmung des Gehaltes an Kakaoschalen in Kakaokernbruch wurden von Streuli und Schär [1953] und Acker et al. [1955] Trennverfahren vorgeschlagen, die auf der unterschiedlichen Dichte der Kakaokerne und Kakaoschalen beruhen. Dabei gab die Summe der nach einem Siebdurchgang von Hand ausgelesenen und durch Schlammung mit konzentrierter Phosphorsäure/Methanol (1 : 1) isolierten Schalenbestandteile den Schalengehalt der Einwaage.
- [0011] Die meisten chemischen Verfahren eignen sich, von Extremfällen abgesehen, nicht zur Bestimmung des Kakao-

schalengehaltes [Lange und Fincke A., 1970]. Dies gilt im Besonderen für die Bestimmung des Rohfasergehaltes, die immer wieder zum Schalennachweis vorgeschlagen wurde. Da sich die Rohfasergehalte der fettfreien Trockenmasse von Kakaokernen und Kakaoschalen nur wenig voneinander unterscheiden, kam Fincke H. [1939] zu der Schlußfolgerung, daß erst Schalengehalte > 15% (berechnet auf Kakaokerne) durch eine Rohfaserbestimmung sicher erkannt werden können. Die Statistische Auswertung von Rohfaseranalysen durch Van Breederode und Reeskamp [1957] zeigte, dass erst bei einem Schalengehalt > 25%, berechnet auf die fettfreie Trockenmasse signifikant hohe Rohfasergehalte zu erwarten sind. Verfahren zur Bestimmung des Rohfasergehaltes über eine Bestimmung des Pektinsäure- bzw. Galakturonsäuregehaltes [Winkler, 1962; Jackson, 1962] sind nicht nur sehr langwierig, sondern liefern auch schlecht reproduzierbare Werte [Lange und Fincke A., 1970].

[0012] Mittels Dünnschichtchromatographie konnte ein zunächst noch nicht identifizierter "Stoff A" in Kakaoschalen nach Anreicherung und Isolierung durch Besprühen der Platten mit unterschiedlichen Reagenzien, Dichlorchinonchlorimid [Wurziger, 1961], Vanillin-HCl [Meyer, 1962], Eisen(III)chlorid, Äthylvanillin, Benzaldehyd, o-Chlorbenzaldehyd, p-Nitrobenzaldehyd, Salicylaldehyd, p-Dimethylaminobenzaldehyd [Fincke A., 1962] aufgrund der daraus resultierenden charakteristischen Färbungen nachgewiesen werden.

[0013] Meyer [1962], Fincke A. und Sacher [1963] sowie Diemair et al. [1963] wiesen in diesem Zusammenhang bereits auf das Vorkommen dieser Verbindung in Kakaokernen der Kakaobohne hin.

[0014] Sacher [1965] gelang es schließlich, diese Verbindung als Behensäuretryptamid zu isolieren und identifizieren. Dieser Schritt ermöglichte dann die Entwicklung eines photometrischen Verfahrens zum Nachweis von Kakaobabfallfetten in Kakaobutter. Dabei wurde die bei Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd entstehende Blaufärbung photometrisch gemessen. Aus deren Intensität konnte man den sogenannten "Blauwert" errechnen. Bei einwandfreier Kakaobutter liegt dieser unter 0.05 [Fincke A. und Sacher, 1963].

[0015] Einen Weg, so den Schalengehalt in Kakaoverzeugnissen quantitativ zu bestimmen, zeigten Acker und Hünemann auf [1966]. Sie stellten zudem Testmischungen mit unterschiedlichen Schalenzusätzen her und verglichen die photometrisch bestimmten Werte mit den mikroskopisch ermittelten nach Schetty [1956] und Van Breederode und Reeskamp [1957].

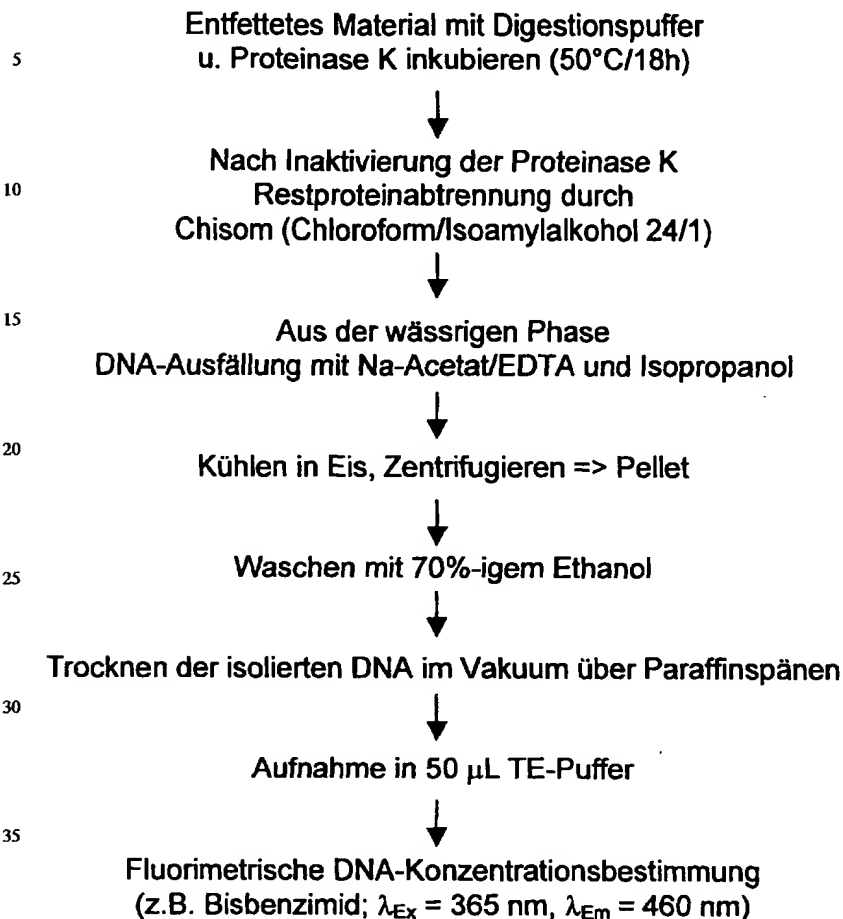
[0016] Das "Blauwert-Verfahren" findet bis heute in der Qualitätskontrolle von Kakaoprodukten Anwendung [IOCCC Method 108, 1988].

[0017] Eine weitere Methode zur Schalenquantifizierung in Kakaoprodukten über den Gehalt an Fettsäuretryptamiden, basierend auf HPLC mit fluorimetrischer Detektion wurde beschrieben [Münch und Schieberle, 1999]. Die Autoren konnten zudem zeigen, dass die "Blauwert"-Methode zu unempfindlich ist, um den Schalengehalt innerhalb des gesetzlich festgelegten Rahmens zu bestimmen.

Beschreibung der Arbeitsschritte

- Isolierung der Gesamt-DNA aus den Kakaoproben
- Einsatz eines Primerpaares, deren Primer komplementär zur schalenspezifischen DNA sind, für die Vervielfältigung der DNA mittels Polymerasekettenreaktion
- Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente
- Semiquantitative Abschätzung des Anteils an Kakaoschalen anhand von Vergleichsproben mit definierten Schalenzusätzen

Schematische Darstellung der Isolierung der Gesamt-DNA aus den Kakaoproben (z. B. Schokolade, Kakaomasse, Kakaopulver)



Herstellung des Test-Kits

[0018] Die Herstellung der Oligonucleotide erfolgte auf dem Wege einer Auftragssynthese. Die Primer wurden den Angaben entsprechend mit Wasser verdünnt und in Eppendorf-Caps mit Konzentrationen von 50 pmol pro Primer pipettiert. Nach einer Vakuumtrocknung wurde je Cap ein RAPD Analysis Bead (Amersham Pharmacia, Freiburg) zugegeben. Ein Bead enthält: AmpliTaq DNA-Polymerase und Stoffel Fragment, BSA (2.5 µg), dNTP's (0.4 mM je dNTP) und Puffer (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3) in einem 25 µL Reaktionsansatz.

Polymerasekettenreaktion

[0019] Für die PCR wird die DNA auf eine Konzentration von 1 ng pro Ansatz verdünnt. Zu Beads, beispielsweise RAPD Analysis Beads (Amersham Pharmacia, Freiburg), die die Primerkombination (50 pmol je Primer) bereits enthalten, werden 24 µL Wasser und 1 µL DNA-Template gegeben.

[0020] Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 5 min/94°C
2. 30 s/94°C
3. 30 s/60°C
4. 30 s/72°C
5. 8 min/72°C
- Die Schritte 2-4 werden 30 x gefahren.
6. kühlen auf 4°C

Elektrophorese

[0021] Die amplifizierten DNA-Fragmente werden anschliessend durch Gelelektrophorese in 3%igem Agarosegel mit 1 µg/mL Ethidiumbromid oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Silberfärbung oder sonstige dem Fachmann be-

kannte Verfahren sichtbar gemacht. Die Konzentration der Amplifikate wird nach Vergleich mit DNA bekannter Konzentration semiquantitativ abgeschätzt. Die Intensität kann auch mit Hilfe eines Densitometers bzw. eines Scanners mit entsprechender Ausstattung ermittelt werden.

Ergebnisse und Diskussion

[0022] Abb. 1 gibt Auskunft über das 229 bp DNA-Fragment in Kakaoschalen und Kakaokernen unterschiedlichen Ursprungs. Starke Banden lassen sich in den Proben 3, 5, 7 und 9 erkennen. Es wird deutlich, dass das 229 bp Fragment in allen untersuchten Kakaoschalen, nicht aber in den Kakaokernen vorkommt. Es wurden Proben aus Ghana, Nigeria, Malaysia und Venezuela untersucht.

[0023] Abb. 2 zeigt das 229 bp Fragment isoliert aus unterschiedlichen Teilen der Kakaopflanze. Die eindeutig stärkste Bande resultiert aus den Kakaoschalen. Schwächer, aber dennoch gut detektierbar folgen die Banden von frischen Blättern des Kakaobaumes sowie Amplikons der Keimlinge. Im Kern lässt sich das 229 bp Fragment wiederum nicht nachweisen.

[0024] Abb. 3 zeigt Kakaokerne mit steigenden Zusätzen an Kakaoschalen. Die zugesetzten Mengen an Schalen betrugen 0,2%, 0,5%, 1%, 2% und 5%. Mit steigenden Schalenzusätzen werden die Banden intensiver. Klar zu erkennen ist bereits ein Schalenzusatz von nur 0,5%. Der laut Gesetz geduldete Schalenanteil von maximal 5% bezogen auf die fettfreie Trockenmasse kann eindeutig nachgewiesen werden.

[0025] Abb. 4 zeigt einige untersuchte Zartbitter- und Vollmilchschokoladenproben aus dem Handel. Auch hier lässt sich das 229 bp Fragment eindeutig nachweisen. Die Vollmilchschokoladen (Proben 2 und 5) zeigen im Vergleich zu den Zartbitterschokoladen (Proben 1 und 4) stärkere Banden. Um nun eine Aussage über den Schallengehalt der Schokoladen zu treffen, werden die Intensitäten der Banden mit jenen der Proben mit definierten Schalenzusätzen verglichen. Der Schallengehalt in den untersuchten Proben liegt nach semiquantitativer Abschätzung in den Zartbitterschokoladen (Proben 1 und 4) um 1%, in den Vollmilchschokoladen (Proben 2 und 5) um 2%. Abb. 5 zeigt das DNA-Fragment aus Kakaomasse und Kakaopulvern aus dem Handel. Schwache Banden zeigen die undotierte Kakakomasse (Probe 1) sowie das Kakaopulver 3 (Probe 6). Deutlich stärkere Banden lassen sich bei Kakaopulver 2 (Probe 5) und Kakaopulver 1 (Probe 4) erkennen. Die stärksten Banden zeigen die mit jeweils 2% Kakaoschalen dotierten Proben Kakaomasse (Probe 2) und Kakaopulver 3 (Probe 7). Vergleicht man die Bandenintensität der Kakaomassen und Kakaopulver mit den Banden der Proben mit definierten Schalenzusätzen (Abb. 5), so lässt sich der Schallengehalt in der Kakaomasse (Probe 1) und im Kakaopulver 3 (Probe 6) auf 0,5%, im Kakaopulver 2 (Probe 5) auf 1% sowie im Kakaopulver 1 (Probe 4) auf 2% semiquantitativ ermitteln.

Literatur

- Acker L., Diemair W., Fincke H. (1955)
Über die Mitverarbeitung kleinkörniger Kakaobohnen-Reinigungsanteile zu Kakaoerzeugnissen unter besonderer Berücksichtigung der Schalenabtrennung mittels der Separostat-Anlage nach J. Toth
Gordian, 55 Nr.: 1317: 13-20
- Acker L., Hünemann E. (1966)
Eine photometrische Methode zur Bestimmung des Schallengehaltes in Kakaoerzeugnissen
Süßwaren, 10: 622-628
- Alpers E. (1927)
Über die Bestimmung der Sklereiden in Kakaoerzeugnissen
Z. Unters. Lebensmittel, 54: 462-466
- Diemair W., Rödder W., Lange H. (1963)
Kakaoschalennachweis
Süßwaren, 7: 68
- Ezendam J. (1924)
Bestimmung des Gehaltes an Kakaoschalen in Kakaopulvern
Pharm. Weekbl. 21: 307
- Fincke A. (1962)
Untersuchungen zur Reinheitsprüfung von Kakaobutter und Schokoladenfetten, 2. Mitteilung: Eine einfache Farbreaktion zum Nachweis von Kakaoabfall-Extraktionsfetten und anderen aus schalenreichen Rohstoffen gewonnenen Kakao-fetten
Süßwaren, 6: 882-883
- Fincke A., Sacher H. (1963)
Untersuchungen zur Reinheitsprüfung von Kakaobutter und Schokoladenfetten, 6. Mitteilung: Quantitative Auswertung der Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd zum Nachweis von Kakaoschalen
Süßwaren, 7: 428-431
- Fincke H. (1939)
Über die chemische Bestimmung des Kakaoschalengehaltes und die Vereinheitlichung der Untersuchungsverfahren für Kakaoerzeugnisse
Bull. Off. Off. Int. Cac. Choc., 9: 395-400
- Fischer B. (1899-1900)
In: Jber. Unters. Amt Breslau: 34
- Griebel, Sonntag (1926)
Zur mikroskopischen Bestimmung des Schallengehaltes in Kakaowaren
Z. Unters. Lebensm., 51: 185-198

- Hanausek T. (1916)
Über den Nachweis der Kakaoschalen in Kakaopulvern
Apothek. Ztg., 31: 323
- Hermann D. (1937)
5 Ein Beitrag zur Frage der quantitativen Bestimmung des Schalenzusatzes in Kakao
Österr. Chem. Ztg. N. F., 40: 527
- Huss A. (1916)
Die Kongorot Brillantblaumethode zum mikroskopischen Nachweis von Kakaoschalen
Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel, 32: 404
- 10 IOCCC International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary (1991):
Method for Determination of the "Blue Value", 108
- Jackson M. (1962)
A spiral vessel count method for estimating pectic acid in cocoa and related products
J. Ass. Off. Agric. Chem., 45: 554–556
- 15 Josephy G. (1953)
Beitrag zur Diskussion über die Schalenbestimmung in Kakaoerzeugnissen, 1. Mitteilung
Mitt. Lebensmitteluntersuch. Hyg., 44: 264–269
- Josephy G. (1956)
Beitrag zur Diskussion über die Schalenbestimmung in Kakaoerzeugnissen, 2. Mitteilung
20 Mitt. Lebensmitteluntersuch. Hyg., 47: 278–287
- Lange H. Fincke A. (1970)
Kakao und Schokolade
In: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. 6, 210–309
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- 25 Meursing E. H. (1973)
Shell Determination in Cocoa Powder
Manufact. Conf. 53 (7): 38–42
- Meyer H. (1962)
Zum Nachweis von Kakaoschalen in Kakaomassen
30 Süßwaren, 6: 644–645
- Münch M., Schieberle P. (1999)
A sensitive and selective method for the quantitative determination of fatty acid tryptamides as shell indicators in cocoa products
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 208: 39–46
- 35 Ruge U., de Ruiter-Morsan N. (1970)
Quantitative Abschätzung des Kakaoschalenanteils in Kakaopulvern mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie
Süßwaren, 14(16): 768–772
- Sacher H. (1965)
Behensäuretryptamid, ein Inhaltsstoff der Kakaoschale
40 Z. Lebensm. Unters. Forsch., 128: 264–267
- Sachsse M., Geuting M. (1956)
Die Bestimmung des Schalengehalts in Kakaoerzeugnissen
Zucker- u. Süßwaren-Wirtsch., 9: 453–455
- Sandbäck K. I. (1957)
45 Quantitative determination of shell content in cocoa products by microscopic counting of the stone cells
Int. Fachschr. Schokolade Indusfr., 12: 187
- Schetty O. (1956)
Die Bestimmung der Kakaoschalen in Kakaoerzeugnissen
Int. Fachschr. Schokolade Industr., 11: 138–142
- 50 Streuli H., Schär J. (1953)
Zur Bestimmung des Schalengehaltes in gebrochenem Kakaokern
Mitt. Lebensmitteluntersuch. Hyg., 4: 270–275
- van Breederode H., Reeskamp C. J. (1957)
Über die Bestimmung des Schalenanteils in Kakaoerzeugnissen
55 Z. Lebensm. Unters. Forsch., 105: 461–473
- Wagenaar M. (1929)
Beiträge zur Schalenbestimmung in Kakao und Kakaoerzeugnissen
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 57: 525–537
- Winkler W. O. (1962)
60 Report on the analysis of cocoa products
J. Ass. Off. Agric. Chem., 45: 551–554
- Wurziger J. (1961)
Eine Farbreaktion zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Schätzung von Kakaoschalen in Kakaoerzeugnissen
Süßwaren, 5: 1350–1354
- 65

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Kakaobestandteilen in Kakaoprodukten durch Amplifizierung und Identifizierung

ausgewählter DNA-Fragmente.

2. Verfahren zum Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoprodukten durch Amplifizierung und Identifizierung ausgewählter DNA-Fragmente, gekennzeichnet durch die Ausführung folgender analytischen Verfahrensschritte:

- Isolierung der Gesamt-DNA aus den Kakaoproben
- Einsatz eines Primerpaares, deren Primer komplementär zur schalenspezifischen DNA sind zur Vervielfältigung der DNA mittels Polymerasekettenreaktion
- Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente
- Semiquantitative Abschätzung des Anteils an Kakaoschalen anhand von Vergleichsproben mit definierten Schalenzusätzen

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass für die Vervielfältigung der pflanzlichen DNA mittels Polymerasekettenreaktion in der zu prüfenden Probe folgende Primer eingesetzt werden:

Primer A: 5'-TGC GGT GGT ATT CTG CCA GAA C-3' (Strang-Primer)

Primer B: 5'-CGC GCA ACA CAT CCT TCA TGC-3' (Gegenstrang-Primer)

4. Verfahren zur Herstellung einer Gensonde, dadurch gekennzeichnet, dass die jeweilige Ziel-DNA einer zufallsgerichteten PCR (5'-AAC GCG CAA-3') unterworfen wird, ein bestimmtes Fragment in einen Vektor kloniert wird, die Insert-DNA dieses Vektors sequenziert wird und danach Oligonucleotide, welche mit dem Ziel-DNA Fragment hybridisieren, konstruiert werden.

5. DNA Fragment, gekennzeichnet durch folgende Sequenz:

```

5' - TGC GGT GGT ATT CTG CCA GAA CGG CGT GAG CTG CAG AGA AGA
3' - ACG CCA CCA TAA GAC GGT CTT GCC GCA CTC GAC GTC TCT TCT

TAC CAT TCG TCT GGG GCA GGT GAT GGT GCT GCC CGA TCT GCT GAA
ATG GTA AGC AGA CCC CGT CCA CTA CCA CGA CGG GCT AGA CGA CTT

ATC TCA GAT CGA GCG GTG TGC CCT TAC AGA TGC GCT GGA AGA TGT
TAG AGT CTA GCT CGC CAC ACG GGA ATG TCT ACG CGA CCT TCT ACA

GTG GAA GGT TAT CCG CGC CTG CAA CGC ATA TAT CGA TCA TCA GGC
CAC CTT CCA ATA GGC GCG GAC GTT GCG TAT ATA GCT AGT AGT CCG

CCC GTG GGC GCT GCG TAT AAC AGA CCC GAA CGC ATG AAG GAT GTG
GGG CAC CCG CGA CGC ATA TTG TCT GGG CTT GCG TAC TTC CTA CAC

TTG CGC G -3'
AAC GCG C -5'

```

6. Alle möglichen DNA-Sequenzen, gekennzeichnet dadurch, dass sie jeweils Teile (Oligonucleotide) der unter Anspruch 5 genannten Sequenzmenge enthalten.

7. Einsatz von Paaren (Strangsequenz mit Gegenstrangsequenz) der unter Anspruch 6 gebildeten Oligonucleotide als Primer für PCR.

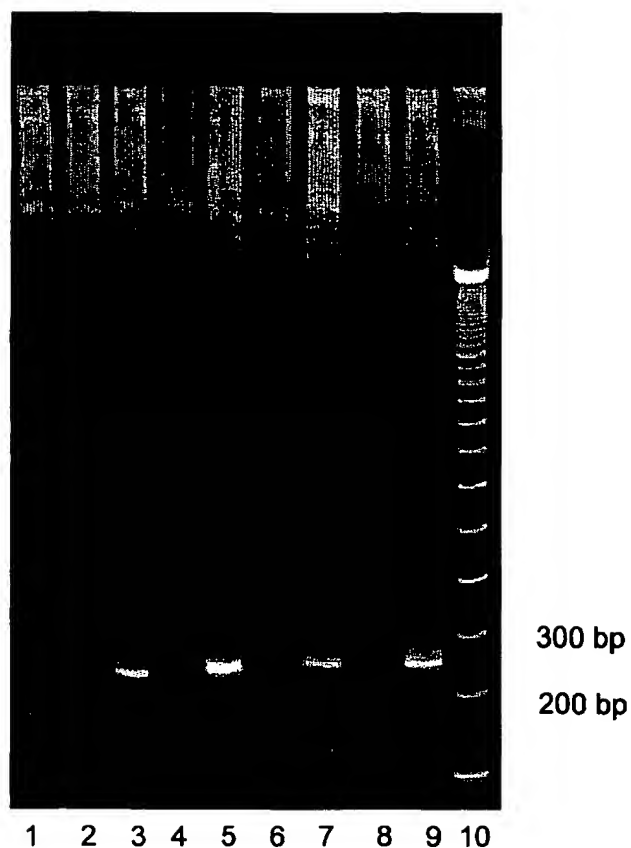
8. Einsatz von einzelnen unter Anspruch 6 genannten Oligonucleotiden als Sonden in DNA-Hybridisierungsexperimenten.

9. Peptidsequenzen, die sich aus allen möglichen 3-Basencodes ergeben, z. B. folgende Sequenz:

TGC GGT GGT ATT CTG CCA GAA CGG CGT GAG CTG CAG AGA AGA TAC
 C G G I L P E R R E L Q R R Y
 5 ATC CAT TCG TCT GGG GCA GGT GAT GGT GCT GCC CGA TCT GCT GAA
 H S S G A G D G A A R S A E I
 10 GTG TCA GAT CGA GCG GTG TGC CCT TAC AGA TGC GCT GGA AGA TGT
 S D R A V C P Y R C A G R C V
 15 CCC GAA GGT TAT CCG CGC CTG CAA CGC ATA TAT CGA TCA TCA GGC
 E G Y P R L Q R I Y R S S G P
 GTG GGC GCT GCG TAT AAC AGA CCC GAA CGC ATG AAG GAT GTG TTG
 V G A A Y N R P E R M K D V L
 20 CGC
 R
 10. Antikörper, die gegen die gezeigte oder Teile der gemäss Anspruch 9 genannten Peptidsequenz erhalten wer-
 25 den.
 11. Verwendung der Antikörper gemäss Anspruch 10 in Immunotestverfahren (ELI-SA, Oberflächenplasmonreso-
 nanzverfahren, etc.)
 12. Verfahren zur Herstellung des Test-Kits, dadurch gekennzeichnet, dass die betreffenden Oligonucleotide in ge-
 löster Form in Analysengefässe eingebracht werden, anschliessend mit dem Fachmann bekannten Verfahren ge-
 30 trocknet werden und dann Analysis Beads (Amersham-Pharmacia, Freiburg) zugegeben werden. Die enthaltenen
 Komponenten werden bei Bedarf in einer definierten Menge Wasser gelöst und mit zu analysierender DNA versetzt
 und eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt.
 Sequenzprotokoll:
 35 5' - TGC GGT GGT ATT CTG CCA GAA CGG CGT GAG CTG CAG AGA AGA
 3' - ACG CCA CCA TAA GAC GGT CTT GCC GCA CTC GAC GTC TCT TCT
 40 TAC CAT TCG TCT GGG GCA GGT GAT GGT GCT GCC CGA TCT GCT GAA
 ATG GTA AGC AGA CCC CGT CCA CTA CCA CGA CGG GCT AGA CGA CTT
 ATC TCA GAT CGA GCG GTG TGC CCT TAC AGA TGC GCT GGA AGA TGT
 45 TAG AGT CTA GCT CGC CAC ACG GGA ATG TCT ACG CGA CCT TCT ACA
 GTG GAA GGT TAT CCG CGC CTG CAA CGC ATA TAT CGA TCA TCA GGC
 CAC CTT CCA ATA GGC GCG GAC GTT GCG TAT ATA GCT AGT AGT CCG
 50 CCC GTG GGC GCT GCG TAT AAC AGA CCC GAA CGC ATG AAG GAT GTG
 GGG CAC CCG CGA CGC ATA TTG TCT GGG CTT GCG TAC TTC CTA CAC
 55 TTG CGC G -3'
 AAC GCG C -5'

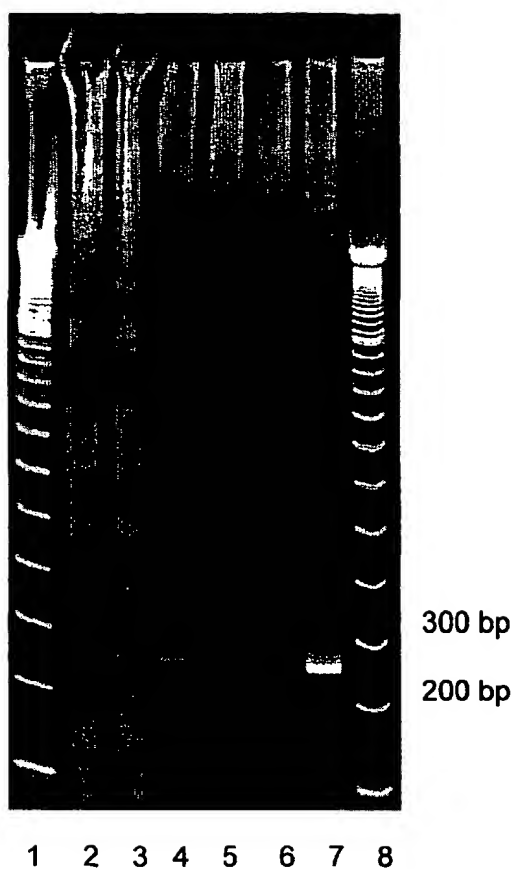
 Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



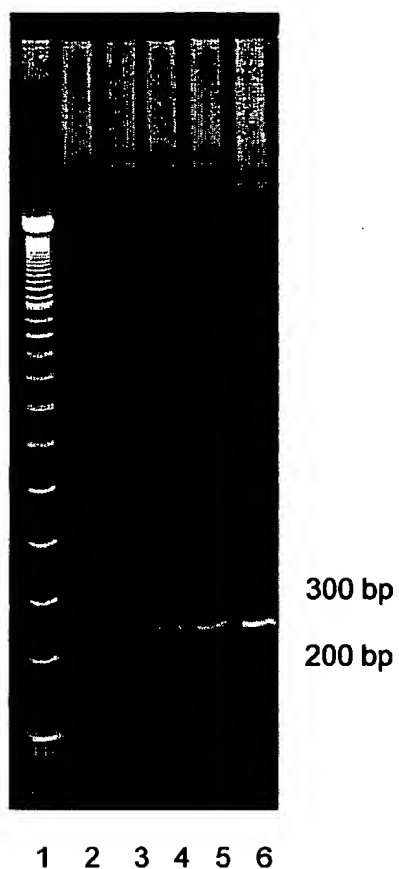
1. Blindprobe
2. Kakaokern Ghana
3. Kakaoschale Ghana
4. Kakaokern Venezuela
5. Kakaoschale Venezuela
6. Kakaokern Nigeria
7. Kakaoschale Nigeria
8. Kakaokern Malaysia
9. Kakaoschale Malaysia
10. 100 bp Marker

Abbildung 1: 229 bp-PCR-Fragmente aus Kakaoschalen und Kakaokernen unterschiedlicher Herkunft (PAGE)



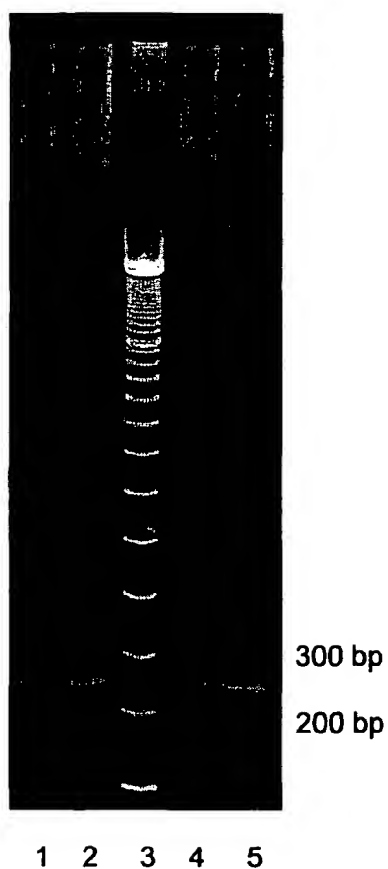
1. 100 bp Marker
2. Kakaoblatt 1
3. Kakaoblatt 2
4. Keimling 1
5. Keimling 2
6. Kakaokern
7. Kakaoschale
8. 100 bp Marker

Abbildung 2: 229 bp-PCR-Fragmente aus Teilen der Kakaopflanze (PAGE)



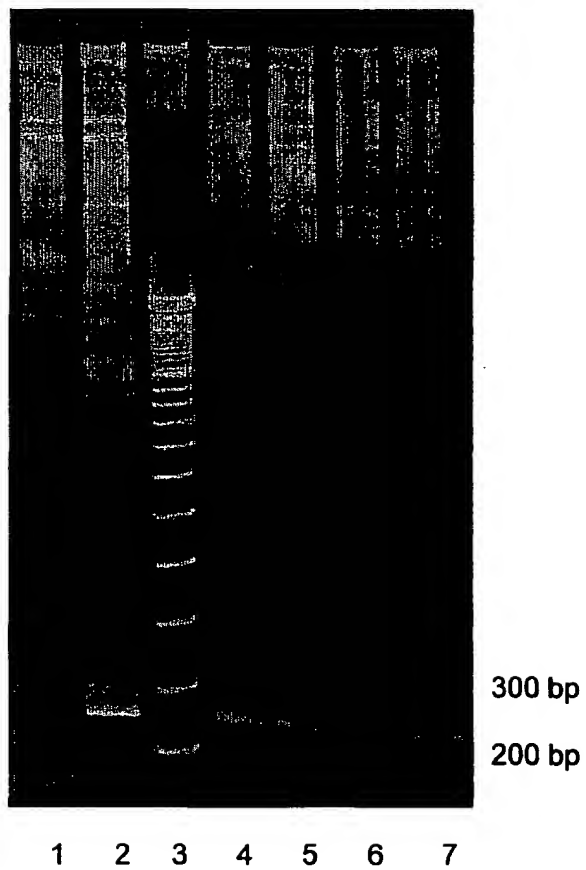
1. 100 bp Marker
2. Kakaokern + 0.2% Schalen
3. Kakaokern + 0.5% Schalen
4. Kakaokern + 1% Schalen
5. Kakaokern + 2% Schalen
6. Kakaokern + 5% Schalen

Abbildung 3: 229 bp-PCR-Fragment aus Kakaokernen mit definierten Schalenzusätzen (PAGE)



1. Zartbitterschokolade 1
2. Vollmilchschokolade 1
3. 100 bp Marker
4. Zartbitterschokolade 2
5. Vollmilchschokolade 2

Abbildung 4: 229 bp-PCR-Fragmente verschiedener Schokoladenproben aus dem Handel (PAGE)



1. Kakaomasse
2. Kakaomasse + 2% Schalen
3. 100 bp Marker
4. Kakaopulver 1
5. Kakaopulver 2
6. Kakaopulver 3
7. Kakaopulver 3 + 2% Schalen

Abbildung 5: 229 bp-PCR-Fragmente aus Kakaomasse und Kakaopulver (PAGE)

First Hit

L12: Entry 17 of 20

File: EPAB

Nov 8, 2001

PUB-NO: DE010019289A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 10019289 A1

TITLE: Method for detecting cocoa components in cocoa products, useful e.g. for quality control, comprises amplifying a new husk-specific DNA

PUBN-DATE: November 8, 2001

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
MUENCH, MICHAEL ANTON	DE
SCHIEBERLE, PETER	DE
FISCHER, MARKUS	DE
BACHER, ADELBERT	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
MUENCH MICHAEL ANTON	DE
SCHIEBERLE PETER	DE
FISCHER MARKUS	DE
BACHER ADELBERT	DE

APPL-NO: DE10019289

APPL-DATE: April 19, 2000

PRIORITY-DATA: DE10019289A (April 19, 2000)

INT-CL (IPC): C07 K 14/415; C07 H 21/04

EUR-CL (EPC): C07K014/415; C12Q001/68

ABSTRACT:

CHG DATE=20020802 STATUS=O>Method for detecting cocoa components in cocoa products comprising amplification and identification of selected DNA fragments, is new. Independent claims are also included for the following: (1) method for preparing a gene probe by subjecting target DNA to randomly directed polymerase chain reaction (PCR), using the primer 5'-AACGCGCAA, cloning a specific amplicon into a vector, sequencing the insert and preparing oligonucleotides that hybridize with the target DNA; (2) 229 bp DNA fragment (I); (3) all possible DNA sequences (II) that contain parts (oligonucleotides; ON) of (I); (4) use of pairs of ON for use as PCR primers; (5) use of single ON as hybridization probe; (6) peptides (III) encoded by (I); (7) antibodies (Ab) directed against (III); and (8) preparation of a test kit containing ON.

First Hit

L12: Entry 17 of 20

File: EPAB

Nov 8, 2001

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 10019289 A1

TITLE: Method for detecting cocoa components in cocoa products, useful e.g. for quality control, comprises amplifying a new husk-specific DNA

Abstract Text (1):

CHG DATE=20020802 STATUS=O>Method for detecting cocoa components in cocoa products comprising amplification and identification of selected DNA fragments, is new. Independent claims are also included for the following: (1) method for preparing a gene probe by subjecting target DNA to randomly directed polymerase chain reaction (PCR), using the primer 5'-AACGCGCAA, cloning a specific amplicon into a vector, sequencing the insert and preparing oligonucleotides that hybridize with the target DNA; (2) 229 bp DNA fragment (I); (3) all possible DNA sequences (II) that contain parts (oligonucleotides; ON) of (I); (4) use of pairs of ON for use as PCR primers; (5) use of single ON as hybridization probe; (6) peptides (III) encoded by (I); (7) antibodies (Ab) directed against (III); and (8) preparation of a test kit containing ON.